

Cosmetic and dermatopharmaceutical compositions containing extract of *Larrea divaricata* or *tridentata*, useful for preventing signs of aging

Patent Number : FR2785804

International patents classification : A61K-007/48 A61K-007/06 A61K-035/78

• Abstract :

FR2785804 A NOVELTY - Cosmetic and dermatopharmaceutical compositions contain an extract of *Larrea divaricata* or *Larrea tridentata*.

DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for the preparation of the composition.

ACTIVITY - Dermatological. The effects of an extract of *Larrea tridentata* on the reduction of neo-synthesis of interleukine-6 (IL-6) in human fibroblasts and keratinocytes, following UV-B irradiation was evaluated. In the absence of the extract, the amount of IL-6 increased by 212 % following irradiation with 35 mJ.cm², and by 439 % following irradiation by 50 mJ.cm². In identical tests, in the presence of 1/100 dilution of extract, the amount of IL-6 was 155 % and 313 % for the two levels of irradiation, and in the presence of 1/10 dilution they were 51 % and 117 % respectively.

MECHANISM OF ACTION - None given.

USE - The compositions reduce or prevent signs of aging (whether due to chronology, or exposure to UV radiation), and hair loss, and provide for the needs of skin, mucous membranes and the scalp. (Dwg.0/0)

• Publication data :

Patent Family : FR2785804 A1 20000519 DW2000-33 A61K-007/48 14p * AP: 1998FR-0014450 19981117

WO200028959 A1 20000525 DW2000-33 A61K-

007/48 Fre AP: 1999WO-FR02735 19991108 DSNW: AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE DK EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZA ZW DSRW: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

AU200011642 A 20000605 DW2000-42 A61K-007/48 FD: Based on WO200028959 AP: 2000AU-0011642 19991108

Priority n° : 1998FR-0014450 19981117

Covered countries : 83

Publications count : 3

• Patentee & Inventor(s) :

Patent assignee : (SEDE-) SEDERMA SA

(SEDE-) SEDERMA

Inventor(s) : LINTNER K

• Accession codes :

Accession N° : 2000-378536 [33]

Sec. Acc. n° CPI : C2000-114759

• Derwent codes :

Manual code : CPI: A12-V01 A12-V04

B04-A10C B10-E02 B14-N17 B14-R01

B14-R02 D08-B03 D08-B09A

Derwent Classes : A25 A96 B04 D21

Compound Numbers : RA00GT-K

RA00GT-M RA00GT-P R06755-K

R06755-M R06755-P

• Update codes :

Basic update code :2000-33

Equiv. update code :2000-33; 2000-42

Others :

Technology Abstract

TECHNOLOGY FOCUS

PHARMACEUTICALS - Preferred

Composition: The extracts contain nordihydroguaiaretic acid (NDGA) (0.05-10, preferably 0.5-5 wt. %) as active component.

The compositions may contain extract (0.1-50, 0.1-10 wt. %) and may be in any galenic form used in cosmetics, such as emulsions, milks, lotions, gels, pomades, hair lotions, shampoos, soaps, sticks, sprays and body oils. The extracts may further be incorporated in carriers such as liposomes, chylomicrons, nano-, micro- and macro-capsules, and may be absorbed onto powders.

Preparation: Extraction may be effected by treating the whole plant or, preferably, the dried flowers, to a known extraction technique using water, propylene glycol, butylene glycol, glycerin, polyethylene glycol, diglycol methyl or ethyl ethers, cyclic polyols, ethoxylated or propoxylated diglycols or lower alcohols. A preferred extraction uses ethanol, which is then evaporated and the product re-dissolved in butylene glycol.

Keyword Index Terms

[1] 102281-0-0-0-CL; 102281-0-0-0-PRD; 200757-0-0-0-CL; 200757-0-0-0-PRD

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 7/48, 7/06, 35/78	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/28959 (43) Date de publication internationale: 25 mai 2000 (25.05.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02735</p> <p>(22) Date de dépôt international: 8 novembre 1999 (08.11.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/14450 17 novembre 1998 (17.11.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SEDERMA [FR/FR]; 29, rue du Chemin Vert, Boîte postale 33, F-91160 Le Perray-en Yvelines (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): LINTNER, Karl [FR/FR]; 15, avenue du Parc, F-78120 Rambouillet (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: COSMETIC OR DERMOPHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING A <i>LARREA DIVARICATA</i> OR <i>LARREA TRIDENTATA</i> EXTRACT FOR SLOWING DOWN SKIN AGEING</p> <p>(54) Titre: COMPOSITIONS COSMETIQUES OU DERMOPHARMACEUTIQUES CONTENANT UN EXTRAIT DE <i>LARREA DIVARICATA</i> OU DE <i>LARREA TRIDENTATA</i></p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns <i>Larrea divaricata</i> or <i>Larrea tridentata</i> extracts wherein have been identified quantities of nordihydroguaiaretic acid capable of being used industrially, and high skin anti-ageing activity have been isolated therein by means of an original operation on the Golgi apparatus. Said <i>Larrea divaricata</i> or <i>Larrea tridentata</i> extracts are used in cosmetic or dermopharmaceutical compositions, as such or for preparing medicines to delay the occurrence of, or for treating, skin-ageing symptoms of whatever origin (whether physiological, exposure to natural or artificial solar UV radiation), for slowing down hair loss and hair and body hair growth, as well as for treating the skin, mucous membranes, skin appendages of the scalp.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne les extraits de <i>Larrea divaricata</i> ou de <i>Larrea tridentata</i>. Nous y avons identifié des quantités d'acide nordihydroguaiarétique compatibles avec une utilisation industrielle, et nous y avons mis en évidence de fortes activités anti-vieillessement cutané par le biais d'une action originale sur l'appareil de Golgi. Ces extraits de <i>Larrea divaricata</i> ou de <i>Larrea tridentata</i> sont utilisés dans des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques, telles quelles ou pour la préparation de médicaments pour retarder l'apparition, ou pour corriger, les manifestations cutanées du vieillissement quel qu'en soit l'origine (physiologique, exposition aux UV solaires naturels ou artificiels), pour ralentir la chute des cheveux ainsi que la pousse des poils et des cheveux; ainsi que pour tous les soins de la peau, des muqueuses, des phanères ou du cuir chevelu.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

COMPOSITIONS COSMETIQUE OU DERMOPHARMACEUTIQUE CONTENANT UN EXTRAIT DE LARREA
DIVARICATA OU DE LARREA TRIDENTATA

5 Aussi loin que l'on puisse remonter, de l'origine de l'humanité à nos jours, l'étude
des civilisations successives démontre que les hommes ont rivalisé d'imagination
et d'ingéniosité pour lutter contre le vieillissement lui même et contre ses
manifestations physiologiques ou purement esthétiques.

De nos jours, ce souci permanent est exacerbé par la mode et par la publicité qui
font toujours référence à la jeunesse, spécialement dans son apparence cutanée
10 souple, lisse et élastique.

Notre mode de vie actuel (agressions physiques et chimiques de la pollution,
consommation d'alcool et de tabac, ...) favorise et aggrave les processus de
vieillissement. Il en est de même pour la perpétuelle quête du bronzage par les UV
naturels ou artificiels.

15 L'industrie cosmétique est en permanence à la recherche de nouveaux ingrédients
capables "*de réparer des ans l'irréparable outrage*", et donc, d'en minimiser les
principales stigmates que sont les rides, le dessèchement et la perte de souplesse.

Jusqu'à maintenant, le discours tenu, tant scientifique que *marketing*, était basé sur
le fait que pour supprimer les traces cutanées du vieillissement, il fallait en
20 supprimer les manifestations visibles.

Une grande partie des solutions proposées a consisté à favoriser (facteurs de
croissance, vitamines, oligo-éléments, vitamines ...) la multiplication des cellules
cutanées. De par leur jeunesse, ces nouvelles cellules, repoussant et remplaçant les
cellules plus âgées, devaient donner un aspect jeune à la peau concernée.

25 D'autres approches, sous-tendues par le même type de raisonnement ont été
développées. C'est ainsi que l'on a vu apparaître le *peeling* qui consiste à enlever,
par abrasion chimique ou mécanique, les couches superficielles de la peau que
constituent les cellules mortes ou sénescents.

Un autre artifice proposé consiste à injecter des composants biochimiques de la
30 peau, comme du collagène) pour en combler les espaces vides.

Diverses crèmes ont également été proposées pour hydrater la peau et lui rendre ainsi un aspect lisse et souple, en accord avec les critères actuels de beauté et de jeunesse.

L'idée qui est à la base de ce brevet est diamétralement opposée.

5 Elle découle d'un raisonnement basé sur une théorie scientifique, connue sous le nom de *Hayflick limit* (Hayflick L. & Moorhead P.S., (1961), *Exp. Cell Res.*25:5585-621; Hayflick L. (1973) *Amer. Journ. Med. Sci.* 265:433-445) qui repose sur le postulat suivant: une cellule animale est programmée pour un certain nombre de multiplication. Sans rentrer dans des détails théoriques, au cours de ses
10 multiplications successives, on constate une perte successive d'information génétique sur l'ADN situé aux extrémités chromosomiques (Olovnikov (1996) *Exp. Gerontol.*31:443-448). Ainsi, chaque cellule posséderait une sorte d'horloge moléculaire interne qui égrènerait le nombre de ses réplifications possibles.

Il a été constaté que la synthèse du collagène de type I et d'enzymes par exemple,
15 diminue progressivement en relation avec l'évolution des cellules productrices vers le stade de sénescence (Kassem & al. (1997) *Osteoporosis int.*7:514-524). Quand on sait que le collagène de type I comble les vides tissulaires, cette théorie, appliquée au niveau cutané, prend une importance cruciale qui, à elle seule, peut expliquer les manifestations cutanées du vieillissement que sont les rides et la
20 perte de souplesse de la peau.

Il en résulte donc une approche totalement opposée à la précédente.

Pour prévenir les manifestations cutanées du vieillissement, il ne faut pas accélérer la prolifération cellulaire mais, au contraire la ralentir, tout comme dans la *dormance* des cellules végétales, phénomène qui permet à certaines plantes de
25 résister aux épisodes climatiques extrêmes rencontrées dans certains déserts.

Ainsi, une cellule rendue quiescente par un quelconque système, se multipliera moins rapidement qu'une cellule dont l'activité est normale, voire stimulée comme dans les approches précédentes décrites au début ce document; ralentissant ainsi le vieillissement physiologique propre à tout organisme vivant.

L'objet de ce brevet réside donc dans l'application industrielle de cette hypothèse et dans la solution pratique que nous y apportons car, après de nombreuses études, nous avons élaboré un extrait végétal qui est capable de répondre à ce dessein, même lorsqu'il est utilisé de manière topique; ce qui rend donc possible son utilisation en Cosmétique et en Dermopharmacie.

La plante utilisée, *Larrea divaricata* ou de *Larrea tridentata* pousse en Amérique, dans le sud des Etats-Unis, au Mexique et au Pérou. Nous avons découvert que le principal principe actif présent dans les extraits de *Larrea divaricata* ou de *Larrea tridentata* faisant l'objet de ce brevet, est l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA).

Le NDGA est un produit connu pour différents effets inhibiteurs tels que sur la sécrétion de prolactine (Tagaya M. et al. (1993) *FEBS Lett.* 324:210-214) ou sur la 5-lipoxygénase exemple (Morris HR & al. (1979) *Br. J. Pharmacol.* 66: 452-465) utilisable dans certaines pathologies mettant en jeu des réactions allergiques telle que l'asthme. Enfin, le brevet WO 95/05156 décrit l'utilisation du NDGA, sous des concentrations de 2 à 64%, dans des compositions à usage topique, dans le traitement des durillons, des cors, des verrues et des hyperkératoses en général.

Plus récemment, Fijiwara T et al. (*J. Biol. Chem.* (1998) 273:3068-3075) a mis en évidence un effet inhibiteur réversible du NDGA sur le transport des protéines dans l'appareil de Golgi, système intracellulaire impliqué dans la sécrétion de protéines.

Ceci pourrait, au moins partiellement, expliquer l'effet de mise en quiescence cellulaire que nous avons découvert car ainsi la cellule pourra s'économiser, sans toutefois arrêter son fonctionnement physiologique normal. Cette hypothèse est confortée par une autre découverte, que nous avons réalisé au cours de la mise au point des extraits faisant l'objet de ce brevet est qu'effectivement, en présence de nos extraits, le taux d'ATP intracellulaire est réduit, traduisant ainsi un ralentissement de son métabolisme énergétique.

Pour obtenir les résultats attendus, il est possible d'utiliser aussi bien la tige que la feuille ou les racines de *Larrea divaricata* ou de *Larrea tridentata*; avec toutefois une préférence pour les feuilles.

Les extraits de *Larrea divaricata* ou de *Larrea tridentata* peuvent être obtenus selon le protocole suivant. Une quantité de 4,0 grammes de feuilles séchées et broyées de *Larrea divaricata* ou de *Larrea tridentata* est ajoutée dans 100 ml de butylène glycol. L'extraction est alors réalisée à 60°C pendant une heure.

5 Naturellement, à condition de respecter cette proportion, il est possible d'utiliser tous les multiples des valeurs données ici.

Après filtration et/ou tamisage, l'extrait obtenu est décoloré par le charbon actif puis, après élimination de ce dernier, l'extrait peut être utilisé tel quel ou peut être concentré sous vide jusqu'à obtention d'une poudre brun clair. Selon les origines
10 des plantes et les méthodes d'extraction utilisées, les analyses réalisées par chromatographie liquide haute performance (CLHP) démontrent la présence de NDGA à des concentrations variant entre 0,5 et 5,0 % (p/p).

Les solvants d'extraction cités ci-dessus ne sont pas limitatifs et peuvent être choisis parmi l'eau, le propylène glycol, le butylène glycol, la glycérine, le polyéthylène
15 glycol, les éthers méthyliques et/ou éthyliques des diglycols, les polyols cycliques, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, les alcools (méthanol, éthanol, propanol, butanol), ou tout mélange de ces solvants.

Par ailleurs, il est possible de réaliser des extraits de *Larrea divaricata* ou de *Larrea tridentata* par d'autres procédés comme, par exemple, la simple décoction, la
20 lixiviation, l'extraction sous reflux, l'extraction au moyen d'ultrasons ou de micro-ondes ou enfin au moyen de techniques à contre courant, sans que cette liste soit limitative.

L'incorporation des extraits de *Larrea divaricata* ou de *Larrea tridentata* dans les compositions cosmétiques est réalisée par tout type de procédé classiquement utilisé
25 en Cosmétologie et en Dermopharmacie.

Sans être limitatifs, les trois exemples suivants donnent des utilisations possibles des extraits obtenus.

Exemple 1: Crème de jour

Carbopol ^R 940	0.3
30 Triéthanolamine	0.3

	Sipol C16/C18 S3	0.5
	Amphisol	2.0
	Tegin 5	1.5
	Céraphil 494	6.5
5	Silicone DC 344	3.0
	Glycérine	3.0
	Extrait de <i>Larrea divaricata</i>	5.0
	Parfum, conservateurs qsp.	100 ml

Exemple 2: Crème antirides

10	Polysorbate 60	3.8
	Stéarate de sorbitan	2.0
	Alcool cétylique	1.5
	Huile de vaseline	13
	Extrait de <i>Larrea tridentata</i>	2.5
15	Eau & conservateurs QSP	100g

Exemple 3: Lait corporel déodorant

	Polysorbate 60	2.5
	Acide oléique	0.9
	Huile de lanoline	2.5
20	Carbopol 940	0.3
	Cire d'abeille	2.0
	Triéthanolamine	0.1
	Glycérine	5.0
	Extrait de <i>Larrea tridentata</i>	4.5
25	Eau & conservateurs QSP	100g

Seuls, trois effets biochimiques et physiologiques bénéfiques mis en évidence au cours du développement des extraits de *Larrea divaricata* ou de *Larrea tridentata*, seront illustrés dans les exemples suivants, sans que cette liste soit pour autant limitative.

30 Exemple 4 Effet anti IL-6 *in vitro*

L'effet des extraits de *Larrea tridentata* sur la réduction de la néo-synthèse d'interleukine 6 (IL-6) a été évalué sur des fibroblastes (FH) et sur des kératinocytes (KH) humains normaux en culture, après irradiations par différentes doses d'UV-B.

- 5 Schématiquement, les cellules sont mise en culture, dans un milieu de culture classique DMEMc + 10% SVF pendant des périodes de 24 heures pour le FH et d'une semaine pour les KH. Après élimination du tampon et deux rinçages successifs par une solution tampon phosphate, les cellules sont irradiées avec des UV-B sous deux niveaux d'énergie standardisés: 35 et 50 mJ.cm². Le tampon est
10 alors rapidement éliminé et remplacé par un milieu de culture identique à celui utilisé en début d'expérience mais contenant les extraits à tester aux concentrations pré-requises ou du DMSO pour la série contrôle. Après 24 heures, le milieu de culture est récolté et la détermination de sa concentration en IL-6 est réalisé, après congélation ou non, au moyen d'une méthode Elisa standard. Une série
15 supplémentaire est réalisée selon le même protocole si ce n'est l'absence d'irradiation UV-B, afin de déterminer le taux de base et de contrôle la stabilité du système étudié. Enfin, les essais sont réalisés en triplicate.

- Dans ces conditions, en l'absence de notre extrait de *Larrea tridentata*, on observe chez le kératinocytes, une augmentation de la libération d'IL-6 dans le milieu
20 extérieur égale à respectivement 212 \pm 7% et 439 \pm 11% après irradiation avec 35 et 50 mJ.cm². Dans les mêmes conditions, les augmentations de la libération d'IL-6 observées ne sont plus respectivement que de 155 \pm 3% et 313 \pm 7% lorsque notre extrait est dilué au 1/100 et de respectivement 51 \pm 4% et 117 \pm 5% en présence de notre extrait dilué au 1/10. Dans les mêmes conditions, des
25 résultats semblables ont été observés sur les cultures de fibroblastes. Enfin, les résultats précédents sont sensiblement reproduits à l'identique si l'on utilise, dans les mêmes conditions, notre extrait de *Larrea divaricata*.

Cet exemple démontre d'une part que le système cellulaire étudié est correct puisqu'on y retrouve bien l'effet dose d'irradiation / augmentation de la libération

d'IL-6 attendue et que, d'autre part, les extraits testés présentent, sur les deux types cellulaires testés, une efficacité réelle qui est dose-dépendante.

Exemple 5: Effet antiproliférateur, *in vitro*

La méthode utilisée ici repose sur le principe suivant. Comme la quantité d'ADN est fixe d'une cellule à l'autre, la mesure de la quantité globale d'ADN correspond à mesurer le nombre de cellule utilisées pour cette mesure. Ce principe permet de ne pas utiliser en routine des méthodologies plus fines mais très lourdes. Différentes techniques ont été développées sur la base de ce protocole dont notamment celle utilisée ici: en se liant à l'ADN, selon une stœchiométrie constante et connu, le fluorophore Hoescht 33258 présente d'une part une fluorescence augmentée mais également un décalage de son spectre d'émission de 492 nm à 458 nm. Par comparaison à des gammes de calibration préalablement établies, le suivi combiné de ces deux paramètres permet de quantifier la quantité d'ADN présente dans les échantillons cellulaires étudiés.

Les cultures cellulaires (FH ou KH) utilisées sont les mêmes quelles décrites dans l'exemple précédent. Le fluorophore Hoescht 33258 est ajouté en fin de manipulation, avant le prélèvement des aliquotes de cellules pour le dosage. Une série contrôle est réalisée (absence d'extrait dans le milieu de culture), afin de déterminer la prolifération cellulaire de base dans le système étudié. Enfin, les essais sont réalisés en triplicate.

Dans ces conditions, lorsque des fibroblastes sont mis en présence de notre extrait de *Larrea tridentata* dilué au 1/100 ou au 1/10, on constate une diminution de la quantité d'ADN (et donc du nombre de cellules présentes) égale à respectivement 5,9 % et 16,3 % par rapport à la série contrôle, donc sans notre extrait de *Larrea tridentata*. Dans les mêmes conditions, des résultats semblables ont été observés sur les cultures de fibroblastes. Enfin, les résultats précédents sont sensiblement reproduits à l'identique si l'on utilise, dans les mêmes conditions, notre extrait de *Larrea divaricata*.

Cet exemple démontre qu'en présence de nos extraits, la multiplication cellulaire est ralentie, sur les deux types cellulaires étudiés. Nos extraits possèdent donc une réelle efficacité anti-proliférative qui est dose-dépendante.

Exemple 6 Diminution du taux intracellulaire d'ATP *in vitro*

5 La mesure de la concentration d'ATP intracellulaire (ou [ATP]_i) est réalisée sur des cellules, fibroblastes ou kératinocytes, en culture, au moyen de la méthode classique de luminométrie qui utilise la propriété du couple luciférine/luciférase d'émettre une quantité de photons proportionnelle à la quantité d'ATP du milieu (par exemple: Doctor et al. *Am. J. Physiol.* 266:C1803-1811). Chacun des puits
10 des plaques 96 trous utilisées sontensemencés avec 20.000 cellules puis, après une période de 24 heures pour le FH ou d'une semaine pour les KH, les cellules sont recouvertes du milieu de culture contenant ou non les extraits de *Larrea tridentata* aux concentrations utilisées dans l'exemple N°4.

Après 24 heures d'incubation, élimination du milieu de culture et rinçage du tapis
15 cellulaire, un aliquote de cellules est prélevé pour effectuer la mesure de l'ATP avec la réaction luciférine/luciférase, au moyen d'un luminomètre (Lumistar BMG dans ces expériences).

Une série contrôle est réalisée par l'ajout de tampon de culture sans produit à tester, afin de déterminer le taux de d'ATP intracellulaire de base. Enfin, les essais
20 sont réalisés en triplicate.

Dans ces conditions, lorsque des fibroblastes sont mis en présence de notre extrait de *Larrea tridentata* dilué au 1/100 ou au 1/10, on constate une diminution de l'[ATP]_i de respectivement $5,3 \pm 0,7$ et $18,2 \pm 1,1\%$ par rapport à la série témoin réalisée sans notre extrait de *Larrea tridentata*. Dans les mêmes conditions, des
25 résultats semblables ont été observés sur les cultures de fibroblastes. Enfin, les résultats précédents sont sensiblement reproduits à l'identique si l'on utilise, dans les mêmes conditions, notre extrait de *Larrea divaricata*.

Cet exemple démontre que les extraits testés présentent, sur les deux types cellulaires étudiés, une efficacité réelle de mise en état de quiescence, qui est
30 dose-dépendante.

En conclusion, les exemples ci-dessus démontrent que les extraits de *Larrea divaricata* ou de *Larrea tridentata*, possèdent un réel effet sur la mise en quiescence des cellules cutanée, leur permettant ainsi un cycle de vie plus long aboutissant ainsi à retarder le vieillissement cutané..

- 5 De par leurs activités démontrées ci-dessus, de telles préparations présentent des effets, anti-vieillessement et antirides, de ralentissement de la chute des cheveux ainsi que de la pousse des poils et des cheveux; protègent la peau des agressions des UV solaires ou artificiels, prolongeant ainsi la souplesse et la fonction protectrice de la peau.
- 10 La concentration de NDGA dans les extraits de *Larrea divaricata* ou de *Larrea tridentata* (dénommés *Extraits* dans la suite de cette description) peut varier entre 0.05 % et 10 % (p/p), préférentiellement entre 0,5 % et 5,0 % (p/p).
La concentration des *Extraits* peut varier entre 0.01 % et 50 % (p/p), préférentiellement entre 0,1 % et 10 % (p/p) dans la composition cosmétique ou
- 15 dermopharmaceutique fini.
Les *Extraits* peuvent être utilisés dans toute forme galénique employée en cosmétique ou dermopharmacie: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles, sans que cette
- 20 liste soit limitative.
Il est possible d'incorporer les *Extraits* dans des vecteurs cosmétiques comme les liposomes, les chylomicrons, les macro-, micro- et nanoparticules ainsi que les macro-, micro- et nanocapsules, de les absorber sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.
- 25 Les *Extraits* peuvent être combinés dans les compositions cosmétiques avec tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétique: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits d'autres plantes, extraits tissulaires, extraits marins.

Les *Extraits* sont utilisés tels quels, dans des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques en tant que telles ou pour la préparation d'un médicament pour les soins de la peau, y compris contre les manifestations cutanées du vieillissement quel qu'en soit l'origine (physiologique, exposition aux UV solaires naturels ou artificiels); ainsi que pour tous les soins de la peau, des muqueuses, des phanères ou du cuir chevelu.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'extraits de *Larrea divaricata* ou de *Larrea tridentata* dans des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques pour éliminer, réduire ou prévenir les manifestations cutanées du vieillissement quel qu'en soit l'origine (physiologique, exposition aux UV solaires naturels ou artificiels), pour ralentir la chute des cheveux ainsi que la pousse des poils et des cheveux; ainsi que pour tous les soins de la peau, des muqueuses, des phanères ou du cuir chevelu.
2. Extraits selon la revendication 1 caractérisés en ce qu'ils contiennent entre 0.05 % et 10 %, préférentiellement entre 0,5 % et 5,0 % (p/p) d'acide nordihydroguaiarétique (NDGA).
3. Procédé d'obtention des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les solvants d'extraction utilisés sont choisis parmi l'eau, le propylène glycol, le butylène glycol, la glycérine, le polyéthylène glycol, les éthers méthyliques ou éthyliques des diglycols, les polyols cycliques, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, les alcools (méthanol, éthanol, propanol, butanol), ou tout mélange de ces solvants.
4. Procédé d'obtention selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que l'extrait est obtenu par extraction éthanolique puis, qu'après séchage, l'extrait sec est repris dans du butylène glycol.
5. Procédé d'obtention des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'extraction peut être remplacée par des techniques de macération ou par d'autres procédés comme, par exemple, la simple décoction, la lixiviation, l'extraction sous reflux, l'extraction au moyen d'ultrasons ou de micro-ondes ou enfin des techniques à contre courant.
6. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisées en ce que l'extrait est obtenu à partir de la plante entière ou, de préférence à partir de la partie aérienne fleurie et sèche.

7. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon la revendication 6 caractérisées en ce que l'extrait est utilisé soit sous forme liquide, soit sous forme sèche obtenue par les techniques classiques de précipitation, de séchage, d'évaporation, d'atomisation ou de lyophilisation.
- 5 8. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une des revendications 6 à 7 caractérisées en ce que la concentration de l'extrait peut varier entre 0,1% et 50 % (p/p), préférentiellement entre 0,1 % et 10 % (p/p) dans le produit fini.
- 10 9. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisées en ce qu'elles se présentent sous toute forme galénique employée en cosmétique ou dermopharmacie: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, pommades, lotions capillaires, shampoings, savons, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.
- 15 10. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une des revendications 6 à 9, caractérisées en ce que l'extrait est incorporé dans des vecteurs cosmétiques comme les liposomes, les chylomicrons, les macro-, micro- et nanoparticules ainsi que les macro-, micro- et nanocapsules, de les absorber sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.
- 20 11. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une des revendications 6 à 10, caractérisées en ce que l'extrait est utilisé avec tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétique: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits d'autres plantes, extraits tissulaires, extraits marins.
- 25 12. Utilisation de l'extrait selon l'une des revendication 1 à 5 ou d'une composition selon l'une des revendications 6 à 11 pour la préparation d'un médicament pour les soins de la peau, y compris contre les manifestations cutanées du vieillissement quel qu'en soit l'origine (physiologique, exposition aux UV
- 30

solaires naturels ou artificiels), pour ralentir la chute des cheveux ainsi que la pousse des poils et des cheveux; ainsi que pour tous les soins de la peau, des muqueuses, des phanères ou du cuir chevelu.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. ...donal Application No

PCT/FR 99/02735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K7/48 A61K7/06 A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 16036 A (BONNE ET AL.) 31 October 1991 (1991-10-31) the whole document	1-12
X	WO 87 06833 A (CHEMEX PHARMACEUTICALS) 19 November 1987 (1987-11-19) the whole document	1-12
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 098, no. 001 (C & JP 09 255551 A (SHISEIDO CO) abstract	1-12
X	EP 0 297 733 A (CHEMEX PHARMACEUTICALS) 4 January 1989 (1989-01-04) the whole document	1-12
-/-		



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 March 2000

Date of mailing of the international search report

10/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 6001,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fischer, J.P.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02735

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 15184 A (LARREA-CORP.) 16 April 1998 (1998-04-16) the whole document	1-12
X	US 4 880 637 A (JORDAN) 14 November 1989 (1989-11-14) the whole document	1-12
A	WO 95 05156 A (SCHERING-PLOUGH HEALTHCARE PRODUCTS) 23 February 1995 (1995-02-23) cited in the application the whole document	1-12
A	EP 0 800 815 A (L'OREAL) 15 October 1997 (1997-10-15) the whole document	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02735

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9116036 A	31-10-1991	FR 2660861 A	18-10-1991
		AT 96657 T	15-11-1993
		AU 645808 B	27-01-1994
		AU 7754091 A	11-11-1991
		CA 2080003 A	13-10-1991
		DE 69100595 D	09-12-1993
		DE 69100595 T	31-03-1994
		DK 524266 T	29-11-1993
		EP 0524266 A	27-01-1993
		ES 2062788 T	16-12-1994
		NZ 237771 A	26-03-1993
		ZA 9102657 A	25-11-1992
WO 8706833 A	19-11-1987	US 4774229 A	27-09-1988
		AU 6729887 A	01-12-1987
		CA 1303497 A	16-06-1992
		ES 2006474 A	01-05-1989
JP 09255551 A	30-09-1997	NONE	
EP 297733 A	04-01-1989	US 5008294 A	16-04-1991
		AU 1736088 A	08-12-1988
		AU 2099092 A	08-10-1992
		CA 1334170 A	31-01-1995
		ES 2020011 A	16-07-1991
		JP 1079112 A	24-03-1989
		KR 9709883 B	19-06-1997
		US 5276060 A	04-01-1994
		ZA 8803957 A	22-02-1989
WO 9815184 A	16-04-1998	US 5837252 A	17-11-1998
		AU 4895697 A	05-05-1998
		US 5945106 A	31-08-1999
		US 6004559 A	21-12-1999
US 4880637 A	14-11-1989	AT 70449 T	15-01-1992
		AU 616641 B	07-11-1991
		AU 8172487 A	25-05-1988
		DE 3775387 A	30-01-1992
		EP 0288534 A	02-11-1988
		JP 1501794 T	22-06-1989
		WO 8803026 A	05-05-1988
		US 5008294 A	16-04-1991
		US 5276060 A	04-01-1994
WO 9505156 A	23-02-1995	AU 7629694 A	14-03-1995
		CA 2169630 A	23-02-1995
		US 5702694 A	30-12-1997
EP 800815 A	15-10-1997	FR 2747568 A	24-10-1997
		CA 2202924 A	17-10-1997
		JP 10036235 A	10-02-1998
		US 5928654 A	27-07-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Date de l'Internationale No

PCT/FR 99/02735

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K7/48 A61K7/06 A61K35/78		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 91 16036 A (BONNE ET AL.) 31 octobre 1991 (1991-10-31) le document en entier	1-12
X	WO 87 06833 A (CHEMEX PHARMACEUTICALS) 19 novembre 1987 (1987-11-19) le document en entier	1-12
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 098, no. 001 (C & JP 09 255551 A (SHISEIDO CO) abrégé	1-12
X	EP 0 297 733 A (CHEMEX PHARMACEUTICALS) 4 janvier 1989 (1989-01-04) le document en entier	1-12
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 3 mars 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 10/03/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Fischer, J.P.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. de Internationale No

PCT/FR 99/02735

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 15184 A (LARREA-CORP.) 16 avril 1998 (1998-04-16) le document en entier	1-12
X	US 4 880 637 A (JORDAN) 14 novembre 1989 (1989-11-14) le document en entier	1-12
A	WO 95 05156 A (SCHERING-PLOUGH HEALTHCARE PRODUCTS) 23 février 1995 (1995-02-23) cité dans la demande le document en entier	1-12
A	EP 0 800 815 A (L'OREAL) 15 octobre 1997 (1997-10-15) le document en entier	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. internationale No

PCT/FR 99/02735

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9116036 A	31-10-1991	FR 2660861 A	18-10-1991
		AT 96657 T	15-11-1993
		AU 645808 B	27-01-1994
		AU 7754091 A	11-11-1991
		CA 2080003 A	13-10-1991
		DE 69100595 D	09-12-1993
		DE 69100595 T	31-03-1994
		DK 524266 T	29-11-1993
		EP 0524266 A	27-01-1993
		ES 2062788 T	16-12-1994
		NZ 237771 A	26-03-1993
		ZA 9102657 A	25-11-1992
WO 8706833 A	19-11-1987	US 4774229 A	27-09-1988
		AU 6729887 A	01-12-1987
		CA 1303497 A	16-06-1992
		ES 2006474 A	01-05-1989
JP 09255551 A	30-09-1997	AUCUN	
EP 297733 A	04-01-1989	US 5008294 A	16-04-1991
		AU 1736088 A	08-12-1988
		AU 2099092 A	08-10-1992
		CA 1334170 A	31-01-1995
		ES 2020011 A	16-07-1991
		JP 1079112 A	24-03-1989
		KR 9709883 B	19-06-1997
		US 5276060 A	04-01-1994
		ZA 8803957 A	22-02-1989
WO 9815184 A	16-04-1998	US 5837252 A	17-11-1998
		AU 4895697 A	05-05-1998
		US 5945106 A	31-08-1999
		US 6004559 A	21-12-1999
US 4880637 A	14-11-1989	AT 70449 T	15-01-1992
		AU 616641 B	07-11-1991
		AU 8172487 A	25-05-1988
		DE 3775387 A	30-01-1992
		EP 0288534 A	02-11-1988
		JP 1501794 T	22-06-1989
		WO 8803026 A	05-05-1988
		US 5008294 A	16-04-1991
		US 5276060 A	04-01-1994
WO 9505156 A	23-02-1995	AU 7629694 A	14-03-1995
		CA 2169630 A	23-02-1995
		US 5702694 A	30-12-1997
EP 800815 A	15-10-1997	FR 2747568 A	24-10-1997
		CA 2202924 A	17-10-1997
		JP 10036235 A	10-02-1998
		US 5928654 A	27-07-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BEST AVAILABLE COPY